 doi 10.3969/j.issn.1673-4254.2017.11.02 J South Med Univ, 2017, 37(11): 1436-1441

基础研究

小鼠白细胞介素-21基因重组腺病毒可控制慢性HBV感染

高雪萍,周 扬,郑新春,易 璇,唐利波,侯金林,李咏茵
器官衰竭防治国家重点实验室//广东省病毒性肝炎研究重点实验室//南方医科大学南方医院感染内科,广东广州 510515

摘要:目的 观察小鼠白细胞介素-21基因重组腺病毒(Ad-GFP-mIL-21)在慢性HBV感染小鼠中的表达以及其对病毒清除和HBV特异性抗体产生的作用。**方法** Ad-GFP-mIL-21体外感染HepG2.2.15细胞后分别采用ELISA和Western blot检测上清和细胞mIL-21的表达;尾静脉注射rAAV8-1.3HBV至野生型C57BL/6小鼠体内建立HBV持续表达模型,12周后实验组尾静脉注射Ad-GFP-mIL-21,以注射空载GFP重组腺病毒或PBS为对照组,荧光显微镜观察Ad-GFP-mIL-21在小鼠体内各器官的表达情况,ELISA检测各组小鼠血清HBsAg、HBsAb、HBcAb和mIL-21的水平。**结果** Ad-GFP-mIL21可在体外感染HepG2.2.15细胞,且上清mIL-21水平与重组载体的滴度和感染时间相关。注射Ad-GFP-mIL21至HBV持续表达小鼠后第4天观察到绿色荧光主要在肝细胞表达;与处理前相比,注射第4天血清mIL-21水平显著升高(P<0.05),而HBsAg滴度则明显下降;实验组和对照组小鼠在注射第13天血清HBsAb均为阴性;与对照组相比,实验组小鼠血清HBcAb水平显著升高(P<0.05)。**结论** Ad-GFP-mIL-21在HBV持续感染小鼠体内可表达mIL-21,并能下调血清HBsAg滴度和促进HBcAb产生,提示其在体内具有控制慢性HBV感染的作用。
关键词:乙型肝炎病毒;小鼠白细胞介素-21;重组腺病毒

A recombinant adenovirus vector carrying murine interleukin-21 gene controls chronic HBV infection in mice

GAO Xueping, ZHOU Yang, ZHENG Xinchun, YI Xuan, TANG Libo, HOU Jinlin, LI Yongyin
State Key Laboratory of Organ Failure Research, Guangdong Provincial Key Laboratory of Viral Hepatitis Research, Department of Infectious Diseases, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To investigate the effect of an adenovirus vector containing murine interleukin-21 gene (Ad-GFP-mIL-21) in virus clearance and on the production of HBV-specific antibodies in mice with persistent HBV infection. **Methods** ELISA and Western blot analysis were used to detect the expression of mIL-21 in the supernatant and cytoplasm of cultured HepG2.2.15 cells after infection by Ad-GFP-mIL-21. Mouse models of chronic HBV infection established by *in vivo* transduction with rAAV8-1.3HBV were divided into 3 groups for treatment 12 weeks later with injection of Ad-GFP-mIL-21, GFP recombinant adenovirus or PBS *via* the tail vein. Serum levels of HBsAg, HBsAb, HBcAb, and mIL-21 in the mice were detected using ELISA, and the expression of Ad-GFP-mIL-21 in the organs was observed by fluorescent microscopy at different time points after the injection. **Results** Ad-GFP-mIL-21 was capable of infecting HepG2.2.15 cells *in vitro*, and the levels of mIL-21 in the supernatant were correlated with the titers of adenovirus administered and the infection time. In the mice with persistent HBV infection, green fluorescence expression was observed almost exclusively in the liver on day 4 after injection of Ad-GFP-mIL21, and serum levels of IL-21 increased significantly compared with the level before treatment (P< 0.05). Although HBsAb was undetectable in both Ad-GFP-mIL21-injected and control mice on day 13, a significantly higher serum level of HBcAb was detected in the mice with Ad-GFP-mIL21 injection (P<0.05). **Conclusion** Ad-GFP-mIL-21 can efficiently express mIL-21 in mice with chronic HBV infection to downregulate serum levels of HBsAg and promote HBcAb production, suggesting its efficacy in controlling chronic HBV infection.
Keywords: hepatitis B virus; murine interleukin-21; recombinant adenovirus

白细胞介素-21(IL-21)是一种具有多样性免疫调节功能的细胞因子,其与IL-2、IL-4、IL-7、IL-9和IL-15同属于I型细胞因子家族成员[1]。IL-21主要由多种活化的CD4$^+$T细胞分泌,包括Th17、NKT和Tfh等细胞亚群[2-4]。既往在慢性淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)感染小鼠模型以及人类免疫缺陷病毒感染人群中的研究发现[5-8],病毒特异性CD4$^+$T和CD8$^+$T细胞功能出现部分耗竭,表现为IL-21分泌不足,而增加IL-21表

收稿日期:2017-06-04
基金项目:国家自然科学基金(81671570)
Supported by National Natural Science Foundation of China (81671570).
作者简介:高雪萍,在读硕士研究生,E-mail: 345530299@qq.com
通信作者:李咏茵,副研究员,硕士生导师,E-mail: yongyinli@foxmail.com;侯金林,教授,主任医师,博士生导师,E-mail: jlhousmu@163.com

达可提高病毒特异性CD8⁺T细胞应答能力，进而控制病毒复制，表明IL-21在慢性病毒感染中对病毒控制和疾病转归有着重要的影响。本课题组前期的研究结果表明[9]，发生HBeAg血清学转换的非活动性携带期(IC)患者血清IL-21水平显著高于HBeAg阳性的免疫耐受期(IT)患者，提示血清IL-21表达上调可能是机体应对慢性感染和控制病毒过度复制的体现。另外，研究发现HBV DNA低水平的慢性乙型肝炎(CHB)患者其血清IL-21水平较病毒载量高水平患者升高[10]。本课题组对两个独立队列的研究也发现CHB患者抗病毒治疗12周血清IL-21水平可以预测52周HBeAg血清学转换，提示IL-21可能通过调控多种免疫细胞参与了HBV清除和疾病转归[9]。在慢性HBV感染中IL-21通过维持HBV特异性$CD8^+$T细胞的功能抑制病毒复制[10]。可见，在人慢性HBV感染中IL-21对病毒控制起了重要作用，并有望成为慢性HBV感染疾病免疫治疗的新靶点。近期体外研究发现外源性IL-21可增强HBV特异性$CD8^+$T细胞的功能并促进其对HBV的控制，揭示了在慢性HBV感染疾病中IL-21具有一定的潜在治疗价值[11-14]。然而，由于体外研究脱离了体内的微环境，其结果未能很好地外推到完整的机体中，且目前关于外源性IL-21在慢性HBV感染小鼠体内作用的研究尚未见报道，因此本研究我们将通过尾静脉注射绿色荧光蛋白(GFP)和小鼠IL-21双基因共表达的重组腺病毒(Ad-GFP-mIL-21)至HBV持续表达小鼠模型体内，观察IL-21对体内HBV相关抗原和抗体产生的作用，为IL-21在慢性HBV感染疾病中的治疗应用提供初步的理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

野生型C57BL/6小鼠(6~8周龄，SPF级)，购于南方医科大学实验动物中心。携带1.3拷贝 HBV 基因组(ayw亚型)的重组 8 型腺相关病毒(rAAV8-1.3HBV)采用尾静脉注射至野生型C57BL/6小鼠体内构建HBV持续表达小鼠模型[15-16]，注射剂量为2×10^{10} vg/200 μL/只。每只小鼠在注射第0、1、2、3、4、6、8、10、12周进行眼眶后采血，收集血清样品用于HBsAg检测。根据第12周血清HBsAg定量水平将建模小鼠分为实验组和对照组，实验组给予尾静脉注射小鼠IL-21-GFP重组腺病毒(Ad-GFP-mIL21，1×10^9 PFU/200 μL/只)，对照组给予尾静脉注射空载GFP重组腺病毒(Ad-GFP，1×10^9 PFU/200 μL/只)或PBS(200 μL/只)，所有小鼠均在注射第1、4、7、10、13天眼眶后取血留取血清进行后续实验。实验动物的使用获得南方医科大学南方医院动物实验伦理会批准。

1.2 实验试剂

rAAV8-1.3HBV(批号：AMV-002 2016041201)购于北京五加和分子医学研究所有限公司，HBsAg(批号：B20150818)、HBsAb(批号：R20151211)和HBcAb(批号：KS20150101)检测试剂盒购于北京万泰生物药业股份有限公司，小鼠IL-21检测试剂盒(批号：4271535)购于eBioscience。

1.3 实验技术

1.3.1 Ad-GFP-mIL-21体外感染HepG2.2.15细胞 采用不同浓度(0、0.5×10^7、1×10^7、3×10^7、5×10^7、10×10^7、20×10^7 PFU)的Ad-GFP-mIL-21感染HepG2.2.15细胞，利用荧光显微镜观察重组腺病毒载体感染情况，并于感染后不同时间点(0、12、24、48、72 h)收集培养上清，采用ELISA检测mIL-21浓度；利用Western blot检测靶细胞内mIL-21的表达。

1.3.2 HBsAg、HBsAb、HBcAb以及mIL-21检测 根据各试剂盒说明书采用酶联免疫试验(ELISA)方法进行检测，并根据相应的标准曲线换算后进行分析比较。

1.3.3 组织荧光染色 取实验组小鼠各器官组织采用OCT(批号：SAKURA 4583)包埋，置于−80 ℃保存，冰冻切片后滴加4,6-二氨基-2-苯基吲哚(DAPI)(批号：ZLI-9557)进行荧光染色。

1.4 统计学处理

所有数据采用Graphpad Prism 5.0进行处理和构图。计量资料采用中位数(四分位数间距)表示，两个或多个相关样本的比较分别采用Mann-Whitney U检验或Friedman M检验，配对样本不同处理的计量资料采用Wilcoxon符号秩检验。$P<0.05$表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 HepG2.2.15细胞表达mIL-21水平与感染Ad-GFP-mIL21病毒量相关

采用不同浓度的Ad-GFP-mIL21感染HepG2.2.15细胞，感染后24 h时HepG2.2.15细胞内即可见明亮绿色荧光，且随着感染病毒载体浓度的增加，可表达绿色荧光蛋白GFP的靶细胞数量增加(图1A)。Western blot检测发现感染Ad-GFP-mIL21的HepG2.2.15细胞在相对分子质量约为18 000处可见阳性印记条带(即mIL-21)，而感染空病毒载体的HepG2.2.15细胞在目的条带处未见任何信号(图1B)。ELISA检测发现Ad-GFP-mIL21感染HepG2.2.15细胞后可产生mIL-21，且细胞培养上清中mIL-21的浓度随着病毒载体浓度和感染时间的延长而增加，呈现浓度时间依赖性；Ad-GFP-mIL21(20×10^7 PFU)感染HepG2.2.15细胞72 h后，上清中mIL-21浓度可高达813.9 pg/mL(图1C)。

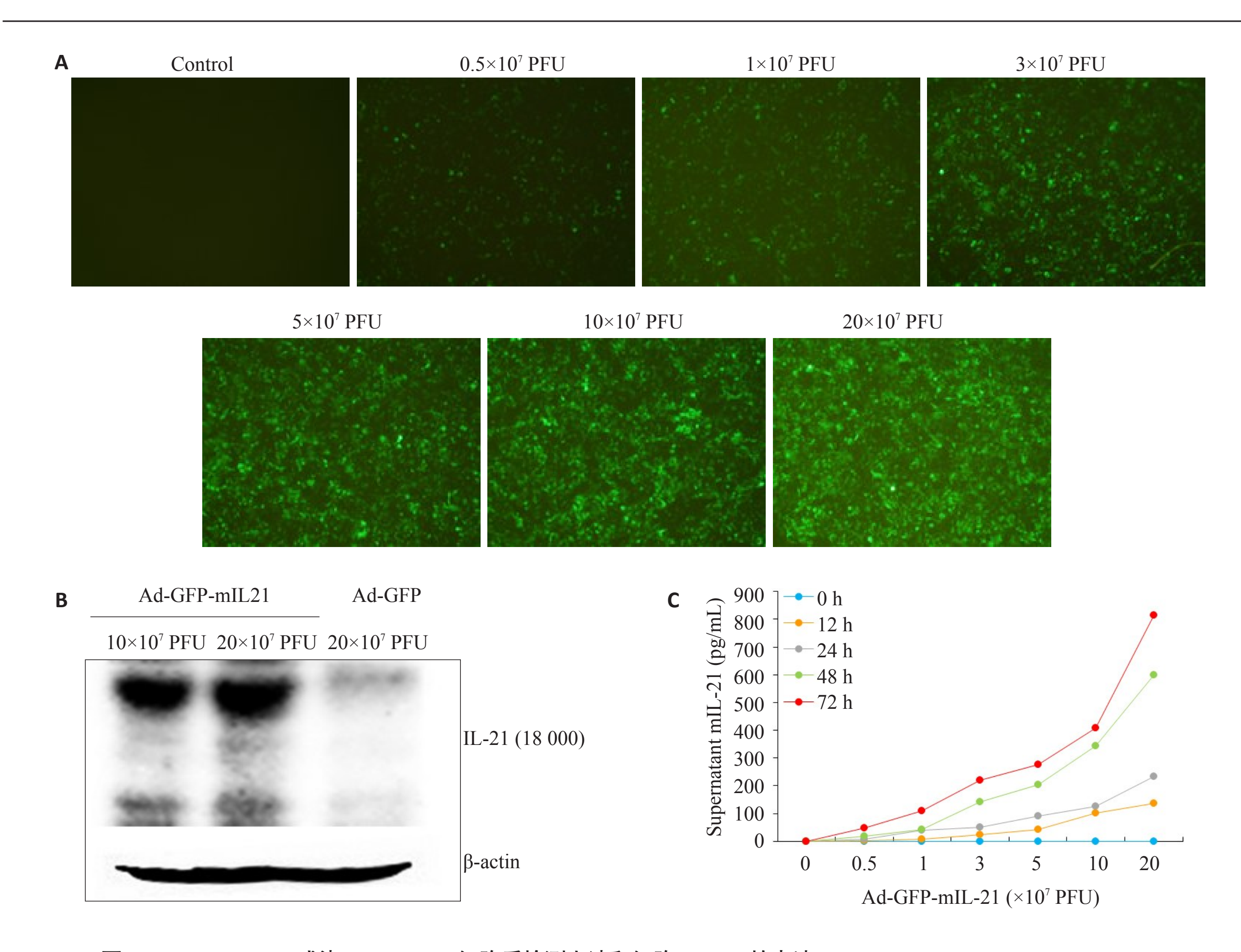


图1 Ad-GFP-mIL21感染HepG2.2.15细胞后检测上清和细胞mIL-21的表达

Fig.1 Expression of mIL-21 in culture supernatant and cytoplasm in HepG2.2.15 cells after infection by Ad-GFP-mIL21. *A*: Observation under fluorescent microscope at 24 h after infection; *B*: Expression of mIL-21 in the cytoplasm after infection; *C*: Concentration of mIL-21 in the culture supernatant after infection.

2.2 Ad-GFP-mIL21主要在小鼠肝脏表达

通过尾静脉注射Ad-GFP-mIL21至HBV持续感染小鼠后观察其在体内的分布，结果发现仅肝细胞可表达绿色荧光蛋白GFP，而其他脏器组织，如肾脏、心脏、脑以及淋巴结等均未见绿色荧光表达（图2A）；此外，Ad-GFP-mIL21予尾静脉注射后第4天，小鼠血清mIL-21水平较处理前显著升高（137.1 pg/mL *vs* 31.83 pg/mL，$P<0.05$，图2A），而注射Ad-GFP或PBS的小鼠血清mIL-21水平未见明显变化（图2B）。

2.3 尾静脉注射Ad-GFP-mIL21可致小鼠血清HBsAg滴度明显下降

ELISA检测发现注射rAAV8-1.3HBV至C57BL/6小鼠12周后血清HBsAg滴度为220.2 U/mL（216.2~262.4 U/mL），而予Ad-GFP-mIL21、Ad-GFP或PBS处理前小鼠血清HBsAg滴度分别为218.2 U/mL（150.7~262.1 U/mL）、228.3 U/mL（217.2~259.1 U/mL）、233.6 U/mL（204.9~262.4 U/mL），组间差异无统计学意义。Ad-GFP尾静脉注射第4天小鼠血清HBsAg滴度为177 U/mL（119.9~224.9 U/mL），而予Ad-GFP-mIL21注射第4天小鼠血清HBsAg滴度为91.61 U/mL（26.03~157.9 U/mL），较处理前下降更明显（图3A）。第13天时Ad-GFP-mIL-21注射小鼠血清HBsAg滴度较Ad-GFP处理小鼠显著下降[27.49 U/mL（9.938~38.04 U/mL）*vs* 102.3 U/mL（66.82~148.1 U/mL），$P<0.05$]。各组小鼠在处理后第13天检测血清HBsAb均为阴性（图3B），但Ad-GFP-mIL21处理小鼠其血清HBcAb水平较注射Ad-GFP或PBS的小鼠显著升高（图3C）。

3 讨论

IL-21是具有强大免疫调节功能的I型细胞因子，可调控多种免疫细胞如B细胞、T细胞的功能，在慢性病毒感染疾病中对病毒控制发挥重要作用[5-7, 17-19]。研究表明急性HBV感染患者血清IL-21的水平显著高于慢性HBV持续感染者[20-21]，当慢性HBV感染者发生HBsAg血清学转换时其血清IL-21水平较未发生HBsAg血清学转换的患者升高[22]，可见IL-21是影响慢性HBV感染转归的重要因素之一。Publicover等[23]在HBV转基因小鼠模型中的研究发现，与幼年小鼠相比，成年受体小鼠肝内IL-21表达水平升高，能诱导有效的细胞免疫和体液免疫应答，肝内$CD8^+$T细胞和B细胞数量增加且功

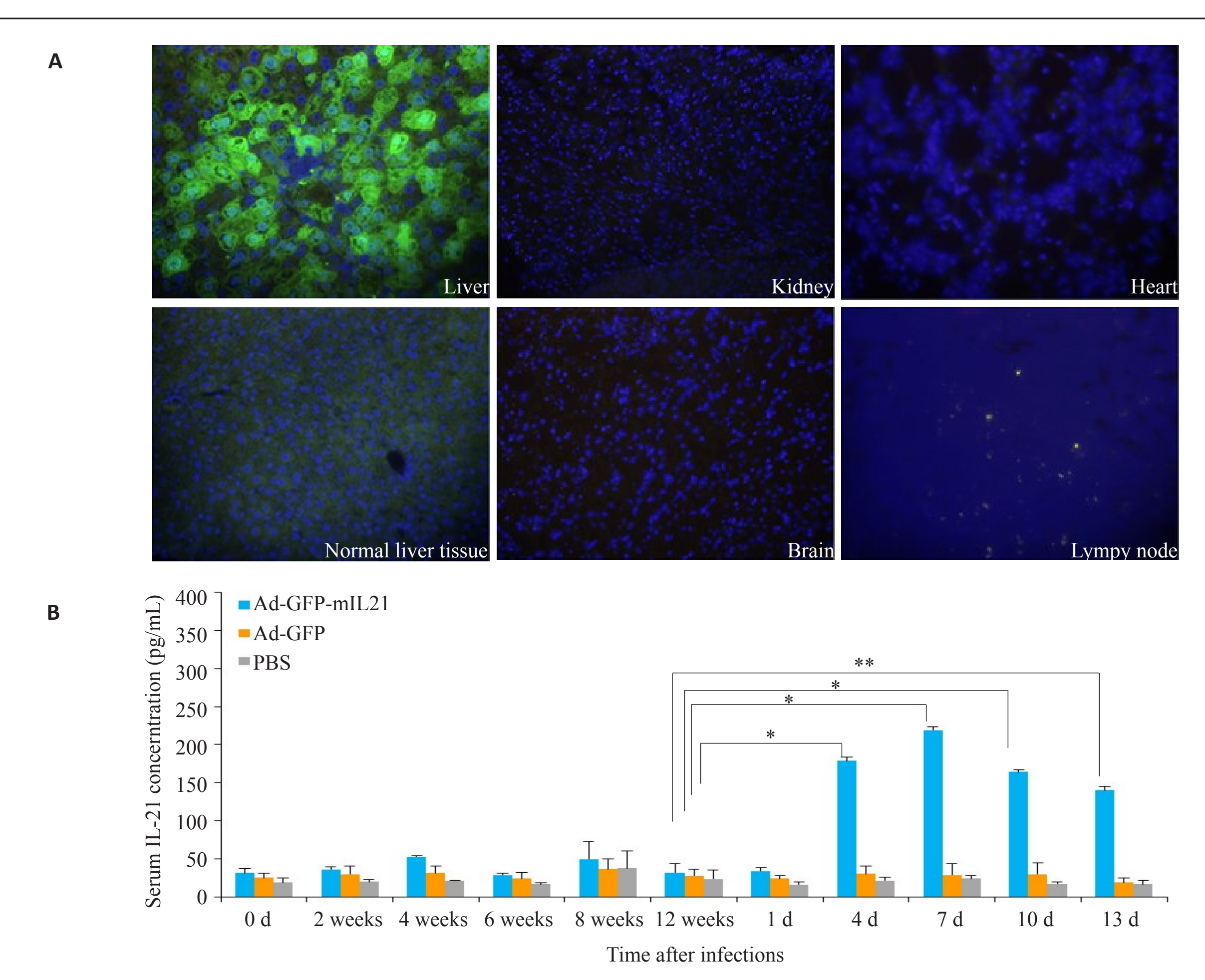


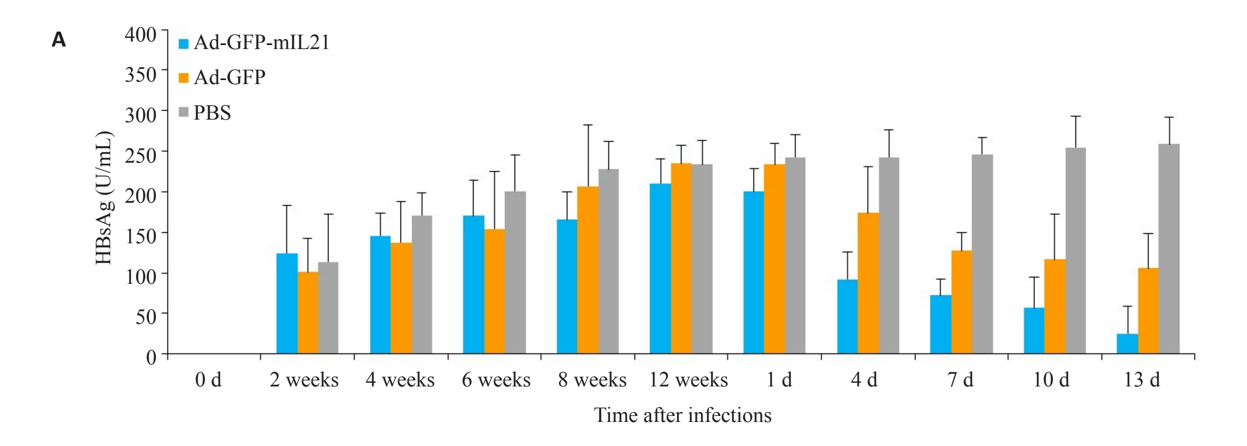
图2 Ad-GFP-mIL21在HBV持续感染小鼠体内各器官的表达以及血清mIL-21在各组的表达水平

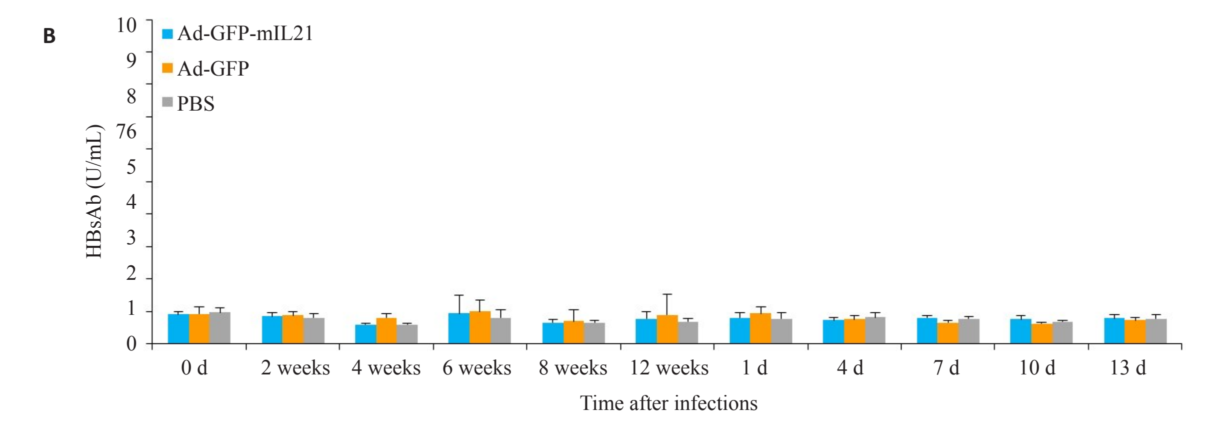
Fig.2 GFP expression in different organs 4 days after injection of Ad-GFP-mIL-21 (*A*) and changes in serum levels of mIL-21 (*B*) after tail vein injection of Ad-GFP-mIL-21, Ad-GFP, or PBS in mice with persistent HBV infection .*P<0.05, **P<0.01.

能增强,最终导致HBsAg清除;当过继转移IL-21R缺陷小鼠的脾淋巴细胞后,成年受体小鼠则无法产生HBsAb,导致HBV抗原持续表达,表明在不同年龄阶段发生HBV感染时,体内IL-21水平与预后密切相关,此研究揭示了IL-21信号通路在控制慢性HBV感染中发挥了作用。虽然最近研究显示IL-21可在体外抑制HBV复制[24],然而在慢性HBV持续感染时,外源性给予IL-21能否在体内直接发挥抗病毒效应尚不明确。因此本研究我们借助HBV持续表达的成年小鼠,探讨外源性IL-21在慢性HBV感染时的作用。由于商品化的重组IL-21价格昂贵,且体内易于降解需多次注射,而重组腺病毒具有构建方便且可稳定表达外源性基因[25],因此本研究中我们选用Ad-GFP-mIL-21重组腺病毒进行研究。

本研究结果表明基于腺病毒载体构建的Ad-GFP-mIL-21在体外可高效感染HepG2.2.15细胞并能产生mIL-21。Ad-GFP-mIL-21通过尾静脉注射到HBV持续表达小鼠模型后发现Ad-GFP-mIL-21腺病毒载体具有嗜肝性,此结果与Tomko等[26-27]的研究一致。此外我们还发现其在体内感染肝细胞后可产生高浓度mIL-21并可显著降低小鼠血清HBsAg滴度。可见,Ad-GFP-mIL-21不仅在体内外均可高效感染靶细胞,且其表达的mIL-21可显示生物学效应,具有应用的潜能。

与Publicover等[24]的研究结果一致,本研究发现HBV持续感染小鼠给予IL-21重组腺病毒注射后其血清HBsAg表达水平逐渐降低,HBcAb滴度明显增加,这一结果表明IL-21可激发体内的体液免疫反应发挥清除病毒作用,且可促进HBV特异性抗体产生。然而,不同于Publicover等[24]在HBV转基因小鼠中的研究结果,本研究中注射了IL-21重组腺病毒的小鼠其血清HBsAb水平仍然处于检测下限,考虑可能是由于小鼠模型不一致所致。本研究中的HBV持续表达小鼠模型通过rAAV8-1.3HBV体内转导法构建,该小鼠模型由于AAV8载体易于诱导免疫耐受导致HBV特异性的体液免疫反应未被充分激活[15],因此在外周血中无法检测到HBsAb。另外,我们考虑亦有可能是体内存在的HBsAg与HBsAb发生了中和反应,致使目前检测手段无法对HBsAb进行定量。此外,由于腺病毒空载体本身可诱导较强烈的天然免疫反应[28-29],给予小鼠注射空载重





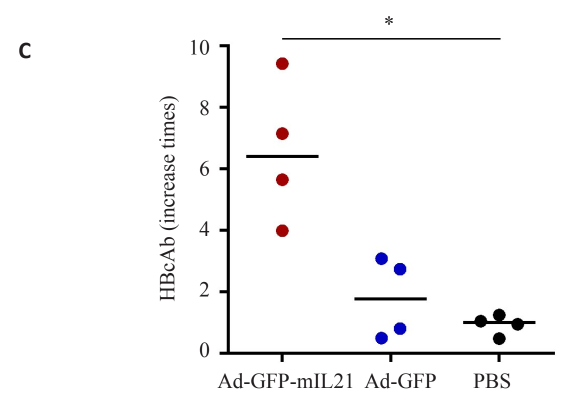


图3 小鼠血清HBsAg、HBsAb和HBcAb的表达水平

Fig.3 Serum levels of HBsAg (*A*), HBsAb (*B*), and HBcAb (*C*) in mice with persistent HBV infection after tail vein injection of Ad-GFP-mIL-21, Ad-GFP, and PBS.

组腺病毒后亦可发现血清HBsAg水平有所降低。

综上所述，本研究结果显示mIL-21重组腺病毒能在体内成功表达mIL-21，且可降低血清HBsAg水平并促进HBcAb产生，表明此重组腺病毒能在慢性HBV小鼠模型中发挥控制病毒的作用，有望成为慢性HBV感染免疫治疗的手段，其在体内发挥作用的具体机制有待后续进一步研究。

参考文献：

[1] Monteleone G, Pallone F, Macdonald TT. Interleukin-21 (IL-21)-mediated pathways in T cell-mediated disease[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2009, 20(2): 185-91.

[2] Muneta Y, Kikuma R, Uenishi H, et al. Molecular cloning, chromosomal location, and biological activity of porcine interleukin-21[J]. J Vet Med Sci, 2004, 66(3): 269-75.

[3] Coquet JM, Kyparissoudis K, Pellicci DG, et al. IL-21 is produced by NKT cells and modulates NKT cell activation and cytokine production[J]. J Immunol, 2007, 178(5): 2827-34.

[4] Fröhlich A, Kisielow J, Schmitz I, et al. IL-21R on T cells is critical for sustained functionality and control of chronic viral infection[J]. Science, 2009, 324(5934): 1576-80.

[5] Yi JS, Du M, Zajac AJ. A vital role for interleukin-21 in the control of a chronic viral infection[J]. Science, 2009, 324(5934): 1572-6.

[6] Elsaesser H, Sauer K, Brooks DG. IL-21 is required to control chronic viral infection[J]. Science, 2009, 324(5934): 1569-72.

[7] Chevalier MF, Jülg B, Pyo A, et al. HIV-1-specific interleukin-21+ CD4^{+} T cell responses contribute to durable viral control through the modulation of HIV-specific CD8^{+} T cell function[J]. J Virol, 2011, 85(2): 733-41.

[8] Ma SW, Huang X, Li YY, et al. High serum IL-21 levels after 12 weeks of antiviral therapy predict HBeAg seroconversion in chronic hepatitis B[J]. J Hepatol, 2012, 56(4): 775-81.

[9] 王绢华, 顾锡炳, 朱银芳, 等. 慢性乙型肝炎患者血清HBV DNA水平无滤泡辅助性T淋巴细胞的关系和意义[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2013, 27(5): 351-3.
[10] Li L, Liu M, Cheng LW, et al. HBcAg-specific IL-21-producing CD4+ T cells are associated with relative viral control in patients with chronic hepatitis B[J]. Scand J Immunol, 2013, 78(5): 439-46.
[11] Ren G, Esser S, Jochum C, et al. Interleukin 21 augments the hepatitis B virus-specific CD8+ T-cell response *in vitro* in patients coinfected with HIV-1[J]. AIDS, 2012, 26(17): 2145-53.
[12] Jie L, Ren WH, Wei M, et al. Inerleukin-21 response in patients with chronic hepatitis B[J]. J Interferon Cykine Res, 2015, 35(2): 134-42.
[13] 成利伟, 孔 歌, 李 莉, 等. 慢性乙型肝炎患者PB MC中H BV特异性IL-21表达及其对CD8+T淋巴细胞功能的影响[J]. 肝脏, 2014, 19(4): 246-9, 253.
[14] 董小岩, 尉迟捷, 王 刚, 等. 高嗜肝性8型重组腺相关病毒体内转导法制备乙型肝炎病毒持续感染小鼠模型[J]. 病毒学报, 2010, (6): 425-31.
[15] 王 刚, 董小岩, 田文洪, 等. 用rAAV8-1.3HBV制备两种品系乙型肝炎病毒感染模型的比较研究[J]. 病毒学报, 2012, (5): 541-7.
[16] Pallikkuth S, Parmigiani A, Pahwa S. Role of IL-21 and IL-21 receptor on B cells in HIV infection[J]. Crit Rev Immunol, 2012, 32(2): 173-95.
[17] Micci L, Ryan ES, Fromentin R, et al. Interleukin-21 combined with ART reduces inflammation and viral reservoir in SIV-infected macaques[J]. J Clin Invest, 2015, 125(12): 4497-513.
[18] Feng G, Zhang JY, Zeng QL, et al. HCV-specific interleukin-21+ CD4+ T cells responses associated with viral control through the modulation of HCV-specific CD8+ T cells function in chronic hepatitis C patients[J]. Mol Cells, 2013, 36(4): 362-7.
[19] 潘庆春, 余永胜, 汤正好, 等. IL-21在急性乙型肝炎中的表达与临床意义[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2013, 22(4): 367-70.
[20] 王驭风, 钱 卫, 夏 澍. HBV不同感染状态者血清IL-21、IFN-γ水平变化及其临床意义[J]. 山东医药, 2017, 57(4): 71-3.
[21] Vyas AK, Sharma BC, Sarin SK, et al. Immune correlates of hepatitis B surface antigen spontaneous seroconversion in hepatitis B e antigen negative chronic hepatitis B patients[J]. Liver Int, 2017, 25(4): 13475.
[22] Publicover J, Goodsell A, Nishimura S, et al. IL-21 is pivotal in determining age-dependent effectiveness of immune responses in a mouse model of human hepatitis B[J]. J Clin Invest, 2011, 121(3): 1154-62.
[23] Li HJ, Kang FB, Li BS, et al. Interleukin-21 inhibits HBV replication *in vitro*[J]. Antivir Ther, 2015, 20(6): 583-90.
[24] Mcneish IA, Bell SJ, Lemoine NR. Gene therapy progress and prospects: Cancer gene therapy using tumour suppressor genes[J]. Gene Ther, 2004, 11(6): 497-503.
[25] Tomko R P XR, MCAR. The human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B coxsackieviruses[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94(7): 3352-6.
[26] 王 鸣, 郭建文, 习 东, 等. 腺病毒载体在小鼠肝脏的分布及其表达规律的研究[J]. 实用肝脏病杂志, 2012, (3): 216-9.
[27] Gao GP, Yang Y, Wilson JM. Biology of adenovirus vectors with E1 and E4 deletions for liver-directed gene therapy[J]. J Virol, 1996, 70(12): 8934-43.
[28] Allweiss L, Dandri M. Experimental *in vitro* and *in vivo* models for the study of human hepatitis B virus infection[J]. J Hepatol, 2016, 64(1 Suppl): S17-31.

（编辑：孙昌朋）